

BEST AVAILABLE COPY

BIOSENSOR

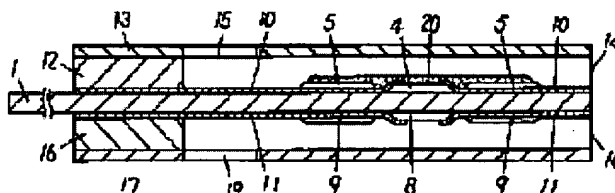
Patent number: JP5196596
 Publication date: 1993-08-06
 Inventor: YOSHIOKA TOSHIHIKO; NANKAI SHIRO
 Applicant: MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD
 Classification:
 - International: G01N27/28; G01N27/327; G01N27/28; G01N27/327; (IPC1-7): G01N27/28; G01N27/327
 - european:
 Application number: JP19920282844 19921021
 Priority number(s): JP19920282844 19921021; JP19910272293 19911021

Report a data error here

Abstract of JP5196596

PURPOSE: To realize the sensor capable of simply performing quick and highly precise determination of a specific component in a reagent liquid, conducting highly precise measurement without any pretreatment of the elimination of a sensor response blockage and simultaneously performing highly precise determination of a plurality of components in the reagent liquid.

CONSTITUTION: Silver paste is printed on an insulation board 1 composed polyethylene terephthalate by means of screen printing, leads 2, 3 are formed, with conductive carbon paste containing resin binder printed a measurement electrode 4 is shaped and with insulation paste printed an insulation layer 10 is formed. The conductive carbon paste containing the resin binder is printed in contact with the lead 3 to form a counter electrode 5. A mix water solution in which glucose oxidase and potassium ferricyanide are dissolved in 0.5wt. % water solution is dripped and dried to form a reaction layer 20.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

THIS PAGE BLANK (USPTO)

特開平5-196596

(43) 公開日 平成5年(1993)8月6日

| (51) Int.Cl. ⁵ | 識別記号 | 序内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
|---------------------------|---------|----------|---------------|---------|
| G 0 1 N 27/327 | | | | |
| 27/28 | 3 3 1 Z | 7235-2 J | | |
| | | 7235-2 J | G 0 1 N 27/30 | 3 5 3 R |
| | | 7235-2 J | | 3 5 3 P |
| | | 7235-2 J | | 3 5 3 V |

審査請求 未請求 請求項の数4(全7頁)

(21) 出願番号 特願平4-282844

(22) 出願日 平成4年(1992)10月21日

(31) 優先権主張番号 特願平3-272293

(32) 優先日 平3(1991)10月21日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000005821

松下電器産業株式会社

大阪府門真市大字門真1006番地

(72) 発明者 吉岡 俊彦

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器
産業株式会社内

(72) 発明者 南海 史朗

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器
産業株式会社内

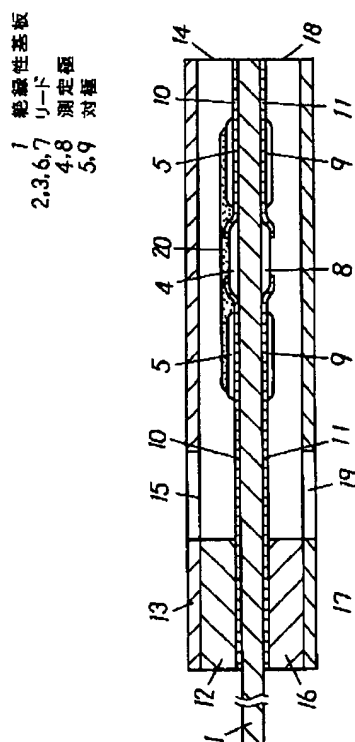
(74) 代理人 弁理士 小鍛冶 明 (外2名)

(54) 【発明の名称】 バイオセンサ

(57) 【要約】

【目的】 本発明は、試料液中の特定成分について、迅速かつ高精度な定量を簡便にできるバイオセンサに関するものであり、センサ応答妨害物除去の前処理をすることなく高精度な測定をすることができ、試料液中の複数成分について同時に高精度な定量ができるバイオセンサを実現することを目的としている。

【構成】 ポリエチレンテレフタレートからなる絶縁性の基板1に、スクリーン印刷により銀ペーストを印刷しリード2、3を形成し、樹脂バインダーを含む導電性カーボンペーストを印刷して測定極4を形成し、絶縁性ペーストを印刷して絶縁層10を形成した。樹脂バインダーを含む導電性カーボンペーストをリード3と接触するように印刷して対極5を形成した。そして、グルコースオキシダーゼおよびフェリシアン化カリウムをカルボキシメチルセルロースの0.5wt%水溶液に溶解させた混合水溶液を滴下し、乾燥させて反応層20を形成した。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 絶縁性の基板と、前記絶縁性の基板の異なる面上に形成された複数組の電極系と、前記絶縁性の基板上に直接または間接的に形成された反応層とからなり、前記反応層が少なくとも酵素と親水性高分子と電子受容体とを含有することを特徴とするバイオセンサ。

【請求項2】 絶縁性の基板の面のうち反応層が形成されていない面上に、電子受容体を設置したことを特徴とする請求項1記載のバイオセンサ。

【請求項3】 絶縁性の基板と、前記絶縁性の基板の異なる面上に形成された複数組の電極系と、前記絶縁性の基板上に直接または間接的に形成された複数の反応層とを備え、前記複数の反応層がそれぞれ少なくとも酵素と親水性高分子と電子受容体とを含有することを特徴とするバイオセンサ。

【請求項4】 複数の反応層中に含有される酵素または酵素の組合せが、互いに異なることを特徴とする請求項3記載のバイオセンサ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、試料中の特定成分について、迅速かつ高精度な定量を簡便に実施することのできるバイオセンサに関する。

【0002】

【従来の技術】試料中の特定成分について、試料液の希釈や攪拌などを行なうことなく簡易に定量しうる方式として、つぎのようなバイオセンサが提案されている（特開平1-291153号公報）。

【0003】このバイオセンサは、絶縁性の基板上にスクリーン印刷等の方法で電極系を形成し、上記電極系上に親水性高分子と酵素と電子受容体からなる酵素反応層を形成し、スペーサー、カバーと共に一体化したものである。

【0004】このようなバイオセンサの動作を以下に説明する。試料液を試料供給口より酵素反応層上へ導入すると、反応層が溶解し、試料液中の基質との間で酵素反応が進行し、電子受容体が還元される。酵素反応終了後、この還元された電子受容体を電気化学的に酸化し、このとき得られる酸化電流値から試料液中の基質濃度を求めるものである。

【0005】さらに、絶縁性の基板の一面上に複数個の電極系および酵素反応層を設置し、複数基質の定量を1つのバイオセンサで実施する形態についても開示されている。

【0006】一方、試料液中の電極反応妨害物質を除去する方法として、以下のようなバイオセンサが提案されている（特開平2-310457号公報）。絶縁性の基板上に形成した電極系上に親水性高分子と酵素および電子受容体からなる酵素反応層を形成し、さらに妨害物質除去用の電極部を付加したものである。試料液を上記パ

イオセンサへ供給すると妨害物質除去用の電極部で試料液中に存在する還元性の物質は電解酸化される。この後に酵素反応層が溶解し、試料液中の基質との間で酵素反応が進行し、電子受容体が還元される。試料液中の還元性の物質は予め妨害物質除去用の電極部で除去されるために安定したセンサ応答を得るものであった。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】このような従来のバイオセンサでは、試料液中の複数成分を一度に定量する場合に次のような課題を有していた。複数の電極系が絶縁性の基板の同一面上に形成されているために、酵素および電子受容体が試料液に溶解した際に、互いに異なる電極系上へ移動し、正確な基質定量ができなくなることがあり、これは特に酵素および電子受容体を電極系上へ固定化しなかった場合によく見うけられていた。

【0008】さらに、従来の妨害物質除去方法については、次のような課題を有していた。試料液中の還元性の物質濃度が高い場合には、前記還元性の物質が妨害物質除去用の電極部において全て電解酸化される前に試料液が酵素反応層に到達し、電極反応に影響を与える。その結果、センサ応答に誤差が生じ、測定精度が低下するといった問題があった。

【0009】本発明は上記課題を解決するもので、迅速かつ高精度な定量を簡便にできるバイオセンサを提供することを目的としている。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明は上記目的を達成するために、絶縁性の基板の異なる面上に複数組の電極系を設けたものである。さらに、絶縁性の基板の異なる面上に設けた複数組の電極系上にそれぞれ異なる酵素あるいは酵素の組合せを含有する反応層を直接または間接的に形成したものである。

【0011】さらに、前記複数の電極系の一部を用いて、センサ応答に影響を与える還元性の物質を定量する構成である。

【0012】

【作用】この構成により、還元性の物質を含む試料液をバイオセンサに供給すると、酵素を含む反応層が形成されていない面上に形成された電極系において、試料液中の還元性の物質を定量することができる。

【0013】酵素を有する反応層が形成された面上に形成された電極系においては、試料液に溶解した反応層中の酵素と測定対象となる基質との間で酵素反応が進行し、電子受容体が還元される。一方、電子受容体は、試料液中の還元性の物質によっても還元される。従って、酵素を有する反応層が形成された面上に形成された電極系上における電子受容体の還元体の生成量は、測定対象となる基質濃度と還元性の物質濃度の双方に依存する。

【0014】本発明によると、酵素を含む反応層が形成されていない面上に形成された電極系により還元性の物

質定量が可能であり、それゆえ、複数の電極系を用いて測定対象となる基質濃度を高精度に定量することが可能なバイオセンサが実現できる。

【0015】さらに、絶縁性の基板の異なる面上に、互いに異なる酵素あるいは酵素の組合せを有する反応層と複数の電極系を設置することで、試料液中の複数の基質を同時にしかも高精度に定量することが可能なバイオセンサが実現できる。

【0016】

【実施例】以下、本発明の一実施例について図を参照しながら説明する。

【0017】（実施例1）本実施例ではバイオセンサの一例として、グルコースセンサを説明する。

【0018】図1は本発明のバイオセンサの一実施例として作製したグルコースセンサの断面図、図2は同グルコースセンサのうち反応層を除き、図1の上方向からみた分解斜視図、図3は同グルコースセンサのうち反応層を除き、図1の下方向からみた分解斜視図、図4は同グルコースセンサの、図1の上方向からみたベース平面図である。

【0019】以下、グルコースセンサの作製方法について説明する。ポリエチレンテレフタレートからなる絶縁性の基板1に、スクリーン印刷により銀ペーストを印刷しリード2、3を形成した。つぎに、樹脂バインダーを含む導電性カーボンペーストを印刷して測定極4を形成した。測定極4はリード2と接触している。つぎに、絶縁性ペーストを印刷して絶縁層10を形成した。絶縁層10は、測定極4の外周部を覆っており、これによって測定極4の露出部分の面積を一定に保っている。

【0020】つぎに、樹脂バインダーを含む導電性カーボンペーストをリード3と接触するように印刷して対極5を形成した。

【0021】上記のようにして電極パターンを印刷した絶縁性の基板1の裏面に、上記同様に、リード6、7、測定極8、対極9、絶縁層11を印刷形成して図4に示すベース30を作製した。

【0022】なお、上記方法の他に、片面のみ電極パターンを形成した絶縁性の基板同士を互いに張り合わせることで前記ベース30を作製することもできる。

【0023】さらに、測定極8、対極9の電極パターンは、測定極4、対極5のパターンと必ずしも同一である必要はなく、例えば図5に示すようなパターンを用いることもできる。

【0024】次に、上記電極系（測定極4、対極5）上に酵素としてグルコースオキシダーゼ（EC 1. 1. 3. 4；以下GODと略す）および電子受容体としてフェリシアン化カリウムを親水性高分子としてカルボキシメチルセルロース（以下CMCと略す）の0. 5wt%水溶液に溶解させた混合水溶液を滴下し、50℃の温風乾燥器中で10分間乾燥させて反応層20を形成した。

【0025】このように親水性高分子、酵素および電子受容体の混合溶液を一度に滴下、乾燥させることによって製造工程を簡略化させることができる。

【0026】上記のようにして反応層20を形成した後、カバー13、17およびスペーサー12、16を図2、図3中、一点鎖線で示すような位置関係をもって接着した。カバーおよびスペーサーに高分子などの透明な材料を用いると、反応層の状態や試料液の導入状況を外部から極めて容易に確認することが可能である。

【0027】また、カバーを装着すると、カバーとスペーサーと絶縁性基板によって出来る空間部の毛細管現象によって、試料液はセンサ先端の試料供給孔14、18に接触させるだけの簡易操作で容易に前記空間部へ導入される。

【0028】なお、試料液の供給をより円滑にするためには、さらにレシチンの有機溶媒溶液を試料供給部から反応層にわたる部位に展開し、乾燥させることでレシチン層を形成するとよい。

【0029】前記レシチン層を設けた場合には、絶縁性の基板1とカバー13、17とスペーサー12、16によって生じる空間部が毛細管現象を発現し得ない程度の大きさとなる場合においても、試料液の供給が可能となる。

【0030】上記のように作製したグルコースセンサに試料液としてグルコースとアスコルビン酸の混合水溶液10μlを試料供給孔14、18より供給した。試料液は空気孔15、19部分までそれぞれ達し、反応層20が溶解する。

【0031】次に対極9を基準にして測定極8に+1Vを印加し、5秒後の電流値 I_0 を測定した。測定極8、対極9上には酵素および電子受容体は存在しないため、 I_0 は試料液中に存在するアスコルビン酸の酸化電流である。また、測定極8、対極9上には物質拡散を抑制するような親水性高分子などがいないため、試料液供給後すぐに I_0 を得ることができる。

【0032】一方、測定極4、対極5上では溶解した反応層20中のGODによりグルコースが酸化され、フェリシアン化カリウムが還元されてフェロシアン化カリウムが生成する。さらに、前記フェリシアン化カリウムはアスコルビン酸によっても還元される。

【0033】試料液を供給してから1分後に対極5を基準として測定極4に+0. 5Vを印加し、5秒後の電流値 I_1 を測定した。 I_1 は上記2種類の還元反応によって生成したフェロシアン化カリウムが酸化される際の酸化電流である。 I_1 および I_0 より算出したグルコース濃度は、アスコルビン酸濃度にかかわらず試料液中に含まれるグルコース量とよく一致した。

【0034】2種類の電極系を絶縁性の基板の異なる面上に配置したことにより、GODなどの反応層構成物質が測定極8上に移動することはなく、精度のよい定量が

可能であった。

【0035】（実施例2）図6は本発明のバイオセンサの別の一実施例として作製したグルコースセンサの断面図である。

【0036】ポリエチレンテレフタレートからなる絶縁性の基板1に、スクリーン印刷により実施例1と同様にしてベース30を形成した。

【0037】測定極4、対極5上に実施例1と同様にして、GODとフェリシアン化カリウムとCMCの混合水溶液を滴下、乾燥して反応層20を形成した。つぎに、10 測定極8、対極9上にフェリシアン化カリウムとCMCの混合水溶液を滴下、乾燥させてフェリシアン化カリウム-CMC層21を形成した。さらに実施例1と同様にして、カバー13、17およびスペーサー12、16と共に一体化してグルコースセンサを作製した。

【0038】上記のように作製したグルコースセンサに試料液としてグルコースとアスコルビン酸の混合水溶液10 μ lを試料供給孔14、18より供給した。試料液は空気孔15、19部分まで達し、反応層20とフェリシアン化カリウム-CMC層21が溶解する。

【0039】測定極8、対極9上では、試料液にフェリシアン化カリウム-CMC層21が溶解し、試料液中のアスコルビン酸によってフェリシアン化カリウムが還元される。試料液を供給して10秒後に対極9を基準にして測定極8に+0.5Vを印加し、5秒後の電流値を測定したところ、試料液中のアスコルビン酸濃度に比例した。

【0040】一方、測定極4、対極5上では、試料液に反応層20が溶解する。反応層20中のフェリシアン化カリウムは、試料液中のアスコルビン酸による還元と、30 試料液中のグルコースがGODによって酸化される際に受ける還元の、2種類の還元反応を受けて、フェロシアン化カリウムが生成する。

【0041】試料液を供給してから1分後に対極5を基準として測定極4に+0.5Vを印加し、5秒後の電流値Iを測定した。

【0042】Iはアスコルビン酸との反応によって生成したフェロシアン化カリウムが酸化される際の酸化電流とグルコースがGODによって酸化された際に還元されて生成したフェロシアン化カリウムが酸化される際の酸化電流の和である。

【0043】測定極8、対極9における応答より試料液中のアスコルビン酸濃度を定量し、Iより得られるフェロシアン化カリウム量とより、試料液中のグルコース濃度を算出することができた。

【0044】測定極8、対極9によって前記酸化電流を測定する際には、測定極8、対極9上にGODが存在すると正確な定量ができない。したがって、本発明のように両電極系を基板の異なる面上にそれぞれ形成することによってGODの測定極8上への移動を完全に防ぐこと

ができ、その結果、高精度な測定が可能となる

（実施例3）本発明のバイオセンサの別の一実施例として、糖センサについて説明する。

【0045】以下、糖センサの作製方法について図7を参照しながら説明する。実施例1と同様にして図4に示したベース30を作製した。次に、GOD、フェリシアン化カリウムおよびCMCの混合水溶液を上記2組の電極系のうち片方の電極系（測定極4、対極5）上に滴下し、乾燥させて反応層20を形成した。

【0046】さらに、酵素としてフルクトースデヒドロゲナーゼ（EC1.1.99.11；以下FDHと略す）、電子受容体としてフェリシアン化カリウムおよび親水性高分子としてヒドロキシエチルセルロース（以下、HECと略す）を緩衝液（pH=4.5）に溶解させた混合水溶液をもう一方の電極系（測定極8、対極9）上に滴下し、乾燥させてFDH反応層22を形成した。さらに実施例1と同様にして、カバーおよびスペーサーと共に一体化して糖センサを作製した。

【0047】このようにして作製した糖センサに試料液としてグルコースとフルクトースの混合水溶液10 μ lを試料供給孔14、18より供給し、1分後に対極5を基準にして測定極4に+0.5Vを、2分後に対極9を基準にして測定極8に+0.5Vを印加し、それぞれ5秒後の電流値を測定した。

【0048】反応層20を配置した電極系（測定極4、対極5）においてはグルコース濃度に対応した電流値が得られ、FDH反応層22を配置した電極系（測定極8、対極9）においてはフルクトース濃度に対応した電流値が得られた。

【0049】試料液に反応層20およびFDH反応層22が溶解すると、試料液中の基質は最終的に酵素によって酸化される。そこでの電子移動によってフェリシアン化カリウムがフェロシアン化カリウムに還元される。次に、上記の一定電圧の印加により、生成したフェロシアン化カリウムが酸化される際の酸化電流が得られ、この電流値は試料液中の基質濃度に対応した。

【0050】反応層20に用いたGODと、反応層22に用いたFDHは、最大の酵素活性が得られるpH条件が異なる。このように、最適なpH条件は用いる酵素の種類によって一般に異なることが多い。

【0051】前記両反応層が基板の同一面上に配置された場合には、FDH反応層中に含まれる緩衝剤成分が試料液内拡散によってGODを含む反応層中に移動し、最適pH条件が得られないことも有り得る。さらに、酵素についても試料液内拡散によって複数の電極系上へ移動する可能性があるため、必ず固定化等によって酵素が移動しない条件設定が必要となり、そのためセンサ構成が制限を受ける場合がある。

【0052】本実施例のように、異なる酵素を含有した反応層を絶縁性の基板の異なる面上に配置することによ

って、それぞれの反応層が試料液に溶解した際に各反応層の構成要素が相互に移動することを防ぐことができ、各電極系上のpHを容易に最適なものに設定するとともに酵素の試料液内拡散を自由にさせることができる。

【0053】上記糖センサに果汁を試料液として供給してセンサ応答を測定したところ、果汁中のグルコースおよびフルクトースを精度よく定量することができた。

【0054】本実施例では互いに異なる酵素を用いて、試料液中の複数の基質成分について定量するバイオセンサに関して述べたが、絶縁性の基板の異なる面上に同一の酵素を用いた反応層を具備したバイオセンサを構成することも可能である。この場合は、試料液中の同一の基質を定量するため、例えば、各電極系において得られる酸化電流値の平均値より基質の定量を実施でき、より精度の高い測定が可能となる。

【0055】なお、上記実施例においては反応層20、フェリシアン化カリウム-CMC層21、FDH反応層22は電極系表面に接して形成する方法について述べたが、必ずしもその必要はない。カバーおよびスペーサーと一体化する場合には、カバーとスペーサーと絶縁性の基板とによって電極系上部に空間部が形成される。前記カバー、スペーサー、絶縁性の基板の前記空間部の壁面に相当する部位であれば適当な場所に反応層を形成することができる。センサに供給された試料液は前記空間部を満たすため、反応層を溶解することが可能である。

【0056】上記実施例ではグルコースとフルクトースの定量法について示したが、本発明はアルコールセンサ、乳酸センサ、コレステロールセンサ、アミノ酸センサなど酵素反応の関与する系に広く用いることができる。

【0057】上記実施例では酵素としてGOD、FDHを用いたが、これ以外に、インペルターゼ、ムタロターゼ、アルコールオキシダーゼ、乳酸オキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、キサンチンオキシダーゼ、アミノ酸オキシダーゼ等も用いることができる。

【0058】上記実施例では親水性高分子としてカルボキシメチルセルロースおよびヒドロキシエチルセルロースを用いたが、これらに限定されることはなく、他のセルロース誘導体、具体的には、ヒドロキシプロピルセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、エチルヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルエチルセルロースを用いてもよく、さらには、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ゼラチンおよびその誘導体、アクリル酸およびその塩、メタアクリル酸およびその塩、スターチおよびその誘導体、無水マレイン酸およびその塩を用いても同様の効果が得られた。

【0059】一方、電子受容体としては、上記実施例に示したフェリシアン化カリウム以外に、p-ベンゾキノ、フェナジンメトサルフェート、メチレンブルー、フェロセン誘導体なども使用できる。

【0060】また、上記実施例において酵素および電子受容体については試料液に溶解する方式について示したが、これに制限されることはなく、固定化によって試料液に不溶化させた場合にも適用することができる。

【0061】また、上記実施例では、測定極と対極のみの二極電極系について述べたが、参照極を加えた三電極方式にすれば、より正確な測定が可能である。

【0062】

【発明の効果】以上の説明から明かなように、本発明によればセンサ応答に妨害を与えるような還元性の物質が含まれる試料液についても、妨害物除去の前処理をすることなく高精度な測定をすることができる。さらに、試料液中の複数成分について同時に高精度な定量を実施することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の一実施例のグルコースセンサの断面図

【図2】同グルコースセンサの反応層を除き、上方向からみた分解斜視図

【図3】同グルコースセンサの反応層を除き、下方向からみた分解斜視図

【図4】同グルコースセンサを上方向からみたベース平面図

【図5】本発明のバイオセンサに用いるベースの別の一例を示す平面図

【図6】本発明のバイオセンサの別の実施例として作製したグルコースセンサの断面図

【図7】本発明のバイオセンサのさらに別の実施例として作製した糖センサの断面図

【符号の説明】

1 絶縁性の基板

2、3、6、7 リード

4、8 測定極

5、9 対極

10、12 絶縁層

12、16 スペーサー

13、17 カバー

14、18 試料供給孔

15、19 空気孔

20 反応層

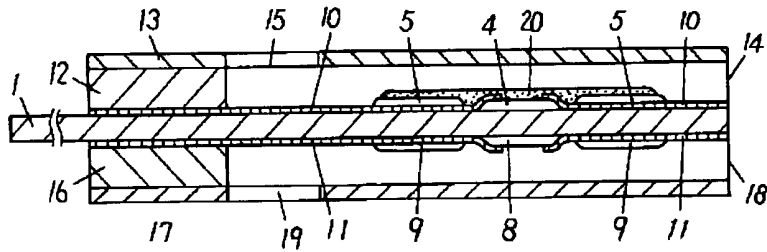
21 フェリシアン化カリウム-CMC層

22 FDH反応層

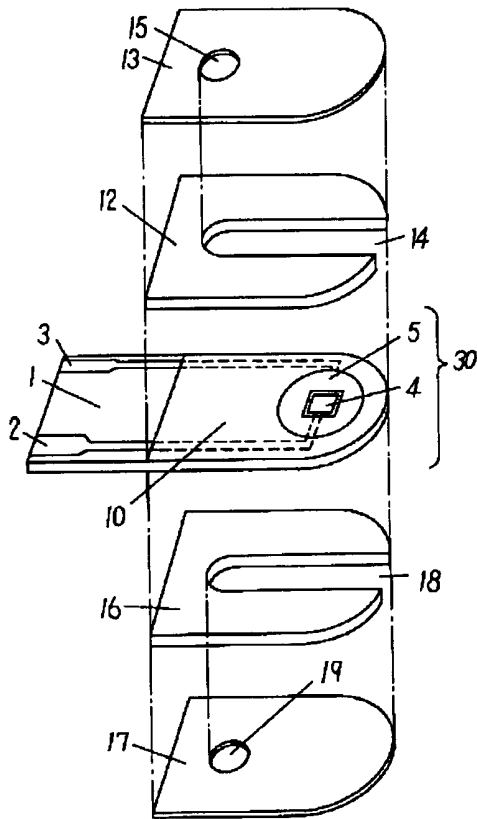
30 ベース

【図1】

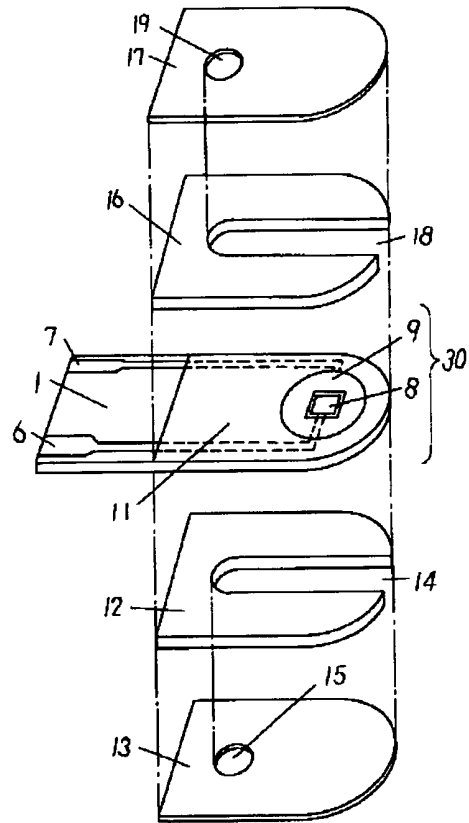
- 1 絶縁性基板
2,3,6,7 リード
4,8 測定極
5,9 対極



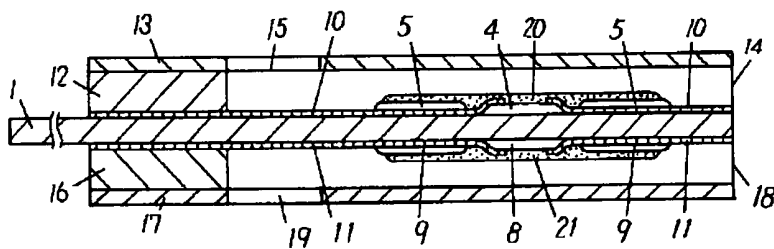
【図2】



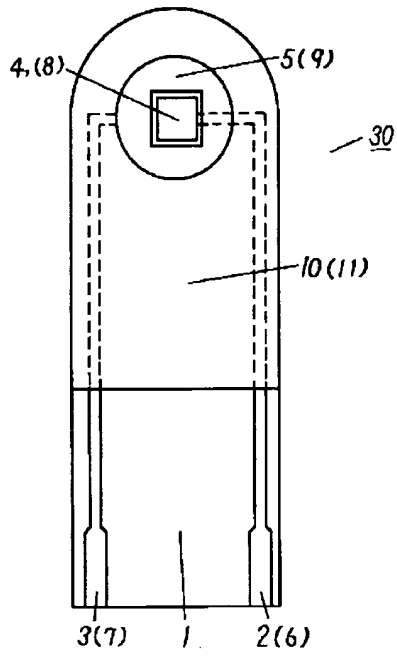
【図3】



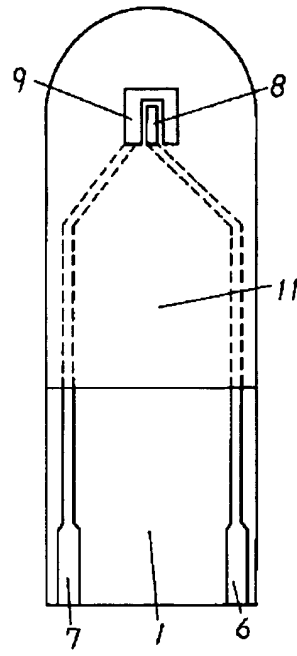
【図6】



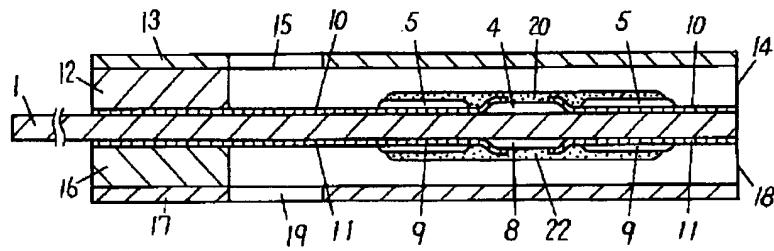
【図4】



【図5】



【図7】



THIS PAGE BLACK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ ~~FADED~~ TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ ~~LINES~~ OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLACK (USPTO)